

**Stress - Hypocalcämie und Calcium-Prophylaxe
von Magen-Ulcera bei Ratten unter besonderer
Würdigung von Calcitonin, Glucagon und
Gastrin im Serum**

von
Peter Hofmann
aus
Bamberg

1977
—

1977 255

Aus der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. med. G. Hegemann)

**Stress - Hypocalcämie und Calcium-Prophylaxe
von Magen-Ulcera bei Ratten unter besonderer
Würdigung von Calcitonin, Glucagon und
Gastrin im Serum**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Peter Hofmann
aus
Bamberg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. P. O. Schwille

Korreferent: Prof. Dr. G. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 1977

EINFÜHRUNG

In früheren Studien über die Pathophysiologie stressbedingter Magenulcerationen bei der Ratte wurden metabolische und endokrine Veränderungen beschrieben, so z. B. der niedrige O_2 -Partialdruck der Magenmucosa, die Hyperglucagonämie und die Hypocalcämie. Eine Verbindung zwischen Calcium-Abfall und Abfall der Serumproteine, bzw. des Hämatokrit, wurde nicht gefunden (1, 2). Exogenes Calcitonin senkt den Serum-Calcium-Spiegel zusätzlich, verhindert aber den Anstieg von Glucagon. Dagegen reduziert Glucagon das Auftreten von Ulcera und läßt Gastrin unverändert (3). Vorherige Adrenalektomie wiederum verhindert das Auftreten der Hypocalcämie. Solche Ergebnisse lassen vermuten, daß die Stress-Hypocalcämie ohne Beeinflussung durch endogenes Calcitonin entsteht. Außerdem könnten im Stress noch bisher unbekannte Zusammenhänge zwischen Calcitonin, Glucagon und Gastrin existieren.

Zuletzt wurde berichtet, daß aus Rattenschilddrüsen extrahierbares Calcitonin mit Antikörpern gegen humanes Calcitonin genügend hoch kreuzreagiert (45). Weiterhin wurde bei hypocalcämischen Zuständen des Menschen

(6) und beim Schwein (7) ein überschießender Ausstoß von Calcitonin aus intrazellulären Speichern beobachtet, wenn Calcium intravenös infundiert worden war (6, 7). Erhöhte Magensäure soll zum Auftreten von blutenden Erosionen beitragen (8, 9). Diese Befunde, sowie die erwiesene hemmende Wirkung von Calcitonin auf die Säuresekretion des Magens (10), veranlaßten die vorliegende Arbeit. Ihr Zweck war, folgende Fragen eingehender zu erforschen :

1. die Natur der Stress-Hypocalcämie an Ratten mit und ohne Calcitonin-Bildungsstätten;
2. liegt ein anti-ulcerogener Effekt von Calcium allgemein vor, wenn es in Form verschiedener Salze verabreicht wird;
3. ist der antiulcerogene Effekt eines bestimmten Calcium-Salzes verknüpft mit der Serum-Konzentration von Calcitonin, Glucagon, Gastrin und mit dem Ulcus-Index.

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß bei Ratten die Entstehung der Stress-Hypocalcämie unabhängig von Calcitonin und Glucagon ist, und daß der nützliche Effekt von exogenem Calcium hauptsächlich durch die Freisetzung von Calcitonin vermittelt wird.

MATERIAL UND METHODEN

Tiere : männliche SPF Wistar-Ratten, Körpergewicht 200 - 250 g, wurden in Makrolonkäfigen unter normaler Laboratoriumsdiät (C 1000/Altromin, Lage, BRD) und unbegrenztem Angebot von Leitungswasser gehalten. Zwei Wochen vor dem Stress-Experiment wurde in Narkose eine Kanüle vom Thomas-Typ (GF) in die Antrum-Region des Magens eingepflanzt.

Narkose : intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Pentobarbital-Natrium (Nembutal, Ch. Böhringer, Ingelheim, BRD). Zur Bewertung der verschiedenen Calcium-Salze in variabler Dosis, des Einflusses der Applikationsart und des pH des Lösungsmittels wurden sowohl nicht-operierte Tiere, als auch solche mit einer Magenfistel eingesetzt. Studien über den Einfluß von Stress alleine und Stress plus Calcium (St + Ca) auf den Ulcus-Index (UI), sowie die Hormonkonzentrationen im Serum, wurden an Magen-fistelratten mit modifiziertem, endokrinem Status (wahlweise Entfernung von Thyreoidea und/oder Parathyreoidea, Nebennierenmark) durchgeführt. Sie wurden in 4 Gruppen randomisiert (jeweils 22-30 Tiere) und als folgende Typen gekennzeichnet :

Nicht operiert = intakt; am Hals scheinoperiert = sham-op; Thyreoidektomie = TX; Thyreoidektomie + Adrenomedul-

lektomie = TX-AMX. Die mikrochirurgische Technik zur isolierten Thyreoidektomie und Thyreoparathyreoidektomie (TPX) wurde früher beschrieben (11). Das Nebennierenmark wurde enukleiert (12). Die Operation wurde 10 Tage vor dem Stressversuch durchgeführt. Der vollständige Ersatz des früheren Markbereichs durch Granulationsgewebe mit intakten Rindenformationen wurde histologisch bewiesen¹⁾. Normale Serum-Thyroxin-Spiegel wurden durch Zugabe von 600 µg/l L-Thyroxine (Henning, Berlin, BRD) zur Trinkflüssigkeit (11) wiederhergestellt. Jede Gruppe dieser Modellratten wurde unterteilt (jeweils n = 8 - 11) : Kontrolle = kein Stress; Stress alleine = St und Stress plus Calcium = St + Ca, d.h. eine 8-stündige Infusion von Calcium-Glukonat über die Magenfistel (s.o.).

Der Einfluß von Stress auf das Serum-Calcium wurde an weiteren Tieren mittels Vormarkierung durch Tracergabe untersucht : subcutane Injektion von 100 µCi ⁴⁵Ca (Buchler-Amersham, Braunschweig, BRD) am 14. Tag vor dem Experimentiertag.

Äußere Bedingungen und Stressmodell : Alle Experimente

¹⁾Die histologischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. P. Hermanek, Abteilung Klinische Pathologie der Chirurgischen Universitätsklinik, Erlangen, durchgeführt.

wurden von Januar bis Dezember 1975 bei Raumtemperatur (rel. Luftfeuchtigkeit 60%) und bei natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus durchgeführt. Stress wurde durch Fesselung in einer Drahtspirale (initiale Äthernarkose) über 8 Stunden (9 - 17 Uhr) erzeugt. Der Grad des Stresses wurde verstärkt durch periodische, elektrische Rechteckimpulse (Stärke 3 - 4 mA, Dauer 250 msec, Intervall 10 sec). Der Ulcus-Index wurde nach Osterloh et al. berechnet (14).

Blutgewinnung : Nach Beendigung der Experimentierzeit wurde innerhalb von 5 Minuten Blut aus der abdominalen Vena cava und der Aorta entnommen. Das Blut wurde in vorgekühlte Röhren entleert, bei 4°C zentrifugiert und das gewonnene Serum bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Eine Herzpunktion wurde vor der Kontroll- oder der Stress-Periode bei den Experimenten über die Natur der Hypocalcämie durchgeführt.

Calcium-Salze : Die jeweils applizierten Dosen sind aus den Tabellen, Graphiken und Legenden ersichtlich. Es wurden pro analysi-Reagenzien von Calcium-Glukonat, -Laktat, -Karbonat (Merck, Darmstadt, BRD) benutzt. Die berechnete, individuelle Dosis wurde einem Gesamtvolumen von 4 ml durch Zugabe von 0.15 m Na-Chlorid (pH 6.3) oder von 0.1 n HCl (pH 1.7) angepaßt und dieses Volumen

fraktioniert oder kontinuierlich infundiert unter Zuhilfenahme einer automatischen Pumpe (Braun, Melsungen, BRD).

Analysen : Gesamt-Calcium mit automatischer, fluorimetrischer EGTA-Titration; ionisiertes Calcium mit einer ionensensitiven Elektrode (Ca-Analyzer SS 20, Orion, Richmond, USA); ^{45}Ca cpm/40 μl Serum in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler unter Verwendung von 10 ml "Biosolve" (Zinsser, Frankfurt, BRD) als Cocktail. Eine weitere Löschkorrektur war nicht erforderlich. Die spezifische Aktivität (S.A. = cpm/mg $\times 10^{-3}$) wurde aus dem Verhältnis von "kaltem" Serum-Calcium zur Radioaktivität berechnet. Die Glucagon-Messung folgte der Methode nach Aguilar-Parada et al. (15), wurde aber als Dysequilibrium-Assay angesetzt, unter Verwendung des 30-K-Antikörpers (Dallas Diabetes Foundation) und eines Standards vom Schwein (pg/ml) (Lilly, Indianapolis, USA); Gastrin mittels eines Assay-Systems für menschliches Gastrin (2). Da auf molekularer Basis die Affinität des Antikörpers für synthetisches G-17 zweimal so hoch ist wie für G-34, wurde die Gastrinkonzentration in G-17 pikogramm-Aequivalenten / ml (h-Gastrin-17, pg-equiv/ml) angegeben. Der Calcitonin-Assay (Dysequilibrium, Tracerzugabe nach 72 Stunden) wurde erst unlängst von Dietrich et al. beschrieben : Ziegen-Antikör-

per (Endverdünnung 1:80 000) gegen synthetisches, menschliches Calcitonin²⁾ und kristallines Calcitonin-M³⁾ als Standard für die Chloramin-T-Iodination. Der mit QUSO G-32 gereinigte Tracer ergab ungefähr 8 000 cpm pro Röhre; Gesamtvolumen pro Röhre 0.5ml; Assay-Verdünnungsflüssigkeit war 10 %-iges Serum von TPX-Ratten in 0.1 ml Tris-Puffer (pH 7.5) und 500 KIU/ml Trasylol. Trennung des antikörpergebundenen und freien Hormons mit Aktivkohle-Dextran nach einer Gesamtkubationszeit von 144 h. Alle Standardwerte und unbekannten Proben wurden in dreifachem Ansatz ermittelt und zur Kontrolle mindestens eine Verdünnungsprobe (1:1) mitgeführt. Die Kreuzreaktion des Assay mit Glucagon und Gastrin bewegte sich, bezogen auf das jeweilige Gewicht, zwischen 5 % (Glucagon) und 8 % (Gastrin). In unseren Versuchen weist diese Methode bei intakten Ratten eine Calcitonin-Immunoreaktivität im peripheren Blut nach intravenöser Calcium-Gabe oder nach Instillation von Calcium über die Magenfistel während 2 Minuten Dauer nach (Abb. 1, 2). Mehrfache Verdünnungen dieses immunreaktiven Peaks ergaben eine mit der Standardkurve dekongungsgleiche Kurve (Abb. 3).

2) Freundlicherweise überlassen von Dr. J. Fischer, Calcium-Forschungslaboratorium, Zürich, Schweiz.

3) Freundlicherweise überlassen von Dr. R. Maier, Ciba-Geigy AG, Basel, Schweiz.

STATISTIK

Falls nicht besonders angegeben, bedeuten die Werte im Abschnitt "Ergebnisse" arithmetische Mittel und 1 Standardfehler. Für gepaarte und ungepaarte Daten wurde der t-Test nach Student als geeignet betrachtet (siehe Legendenden). Außerdem wurden Korrelationen berechnet und dafür Programme eines Algotronic-Tischcomputers (Diehl, Nürnberg, BRD) verwendet.

ERGEBNISSE

1. Calcitonin-Sekretion ohne Stress

Im Serum von intakten Ratten ist vor und nach der Calcium-Zufuhr Calcitonin nachweisbar (Abb. 1 links, Abb. 2, Tab. 2, C), ebenso bei TX-Ratten. Im Vergleich zu den vorigen ist jedoch Calcitonin niedriger. Ein ähnlich niedriger Wert wird bei TPX-Ratten gefunden (Abb. 1, Mitte). Nur bei TX-AMX-Ratten bleibt Calcitonin unter der Nachweisgrenze (Tab. 2). Ebenso werden nach isolierter Adrenomedullectomie (Abb. 1, rechts) Nullwerte gefunden, was auf das Nebennierenmark als mögliche Calcitonin-Quelle hindeutet (15). Das Nüchtern-Calcitonin im Serum ist möglicherweise extrathyreoidalen Ursprungs. Unter intravenöser Calcium-Belastung steigt Calcitonin an. Dieser Anstieg von Calcitonin nach Calcium-Gabe ist

deutlich niedriger bei AMX-Ratten im Vergleich zu intakten Ratten. Eine vorherige Thyreoparathyreoidektomie verhindert eine Calcitonin-Freisetzung, auch unter Calcium-Belastung (Abb. 1).

2. Natur der Stress-Hypocalcämie

Während Stress fallen Gesamt-Calcium und ionisiertes Calcium signifikant ab, unabhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit von Calcitonin-Bildungsstätten. Der prozentuale Abfall der Serum-Radioaktivität (^{45}Ca) bei TX-AMX-Ratten ist nicht signifikant, aber die spezifische Aktivität des ^{45}Ca ist ziemlich konstant in jeder Tiergruppe (Abb. 4).

3. Antiulcerogener Effekt von Calcium-Salzen im Stress (intakte Ratten)

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse für die Hormone und das Calcium im Serum. Außerdem den anti-ulcerogenen Effekt, wie er mit Calcium-Glukonat, -Laktat und -Karbonat erzielt werden kann. Entsprechend hängt der prophylaktische Effekt von Calcium von vier Variablen ab : der Art der Calcium-Verabreichung, z. B. sind mehrmalige subcutane Injektionen offensichtlich nicht wirksam; der applizierten Dosis, die für Calcium-Glukonat im einzelnen angegeben ist; dem begleitenden Anion; dem pH des Lösungsmittels.

Der größte anti-ulcerogene Effekt wird durch intragast-
rale Infusion (über die Magenfistel), entweder mit
Calcium-Glukonat (+ 67 %) oder mit Calcium-Karbonat
(+ 71 %) in einer Dosis von 45 mg/kg/8h bei pH 6.3 er-
reicht. Gegenüber den Daten ungestresster Kontrolltiere
(Abb. 1, Tab. 2, intakt, C) ist kein Anstieg des Serum-
Calcium zu beobachten. Die Gastrin- und Calcitonin-Spie-
gel erlauben ebenfalls keine Aussage über die Wirkung
einer bestimmten Form der Calcium-Gabe. Plasma-Glucagon
(normal 40 - 130 pg/ml) ist erhöht, wie es für Stress-
Situationen oft beschrieben wurde.

4. Anti-ulcerogener Effekt von Calcium-Glukonat im Stress bei verschiedenen Rattenmodellen (Tab. 2)

Mit einer kontinuierlichen, intragastralen Infusion dieses
Salzes gelingt eine drastische Verbesserung des Ulcus-In-
dex (UI) nur bei Ratten mit in situ belassener Schild-
drüse (intakt, sham-op.). Die prozentuale Abnahme des UI
ist vergleichbar : 67.8 (intakt) gegenüber 71.5 (sham-
op.). Der UI ist gering reduziert bei TX- und TX-AMX-Rat-
ten (33.5 % bzw. 48.5 %). Das Serum-Calcium fällt trotz
exogener Zufuhr während des Stresses generell ab. Das glei-
che gilt für die anderen Formen der Calcium-Applikation
(Tab. 1). Werden Stress und Calcium gemeinsam appliziert,
persistiert die Hypocalcämie nur dann, wenn die Schild-
drüse in situ verblieben ist (intakt, sham-op.), wogegen

das Serum-Calcium bei TX-Ratten (mittlerer Zuwachs 0.60 mg %) und bei TX-AMX-Ratten (mittlerer Zuwachs 1.35 mg %) ansteigt. Serum-Calcitonin wird nicht vom Stress alleine beeinflusst. Unter Stress + Calcium tendiert es zu höheren Werten bei intakten und sham-op. Ratten, nicht jedoch bei TX-Ratten. Wieder sind die Konzentrationen von Gastrin und Glucagon uncharakteristisch, mit einer bemerkenswerten Ausnahme : Gastrin fällt ab, wenn intakte Ratten gestresst werden und zusätzlich eine Calcium-Infusion erhalten.

5. Rechnerische Zusammenhänge zwischen Serum-Calcium, Serum-Hormonen und Ulcus-Index (Tab. 3)

Zwischen stressbedingt niedrigem Serum-Calcium, Calcitonin oder Glucagon - beides Hormone, welche über eine Verminderung der Knochenresorption hypocalcämisch wirksam sind - gibt es keine Korrelationen. Diese Aussage gilt sowohl unter Berücksichtigung der individuellen Werte von schilddrüsen-intakten Ratten (nicht dargestellt), als auch für die Berücksichtigung der Mittelwerte der 3 Variablen (diese Darstellung). Ebenso existiert keine Korrelation zwischen Calcium und Gastrin, einem Hormon, welches möglicherweise hypocalcämische Aktivität besitzt ('17). Umgekehrt bestehen signifikante Korrelationen zwischen Calcitonin auf der einen Seite und Glucagon und Gastrin auf der anderen. Dies legt die Annahme nahe, daß die beiden letzteren

die Calcitonin-Sekretion unabhängig von der Konzentration des Serum-Calcium beeinflussen können : Calcitonin ist direkt korreliert mit Glucagon (Stress alleine) und umgekehrt mit Gastrin (Stress + Ca). Gastrin selbst ist umgekehrt korreliert mit der Summe von Calcitonin und Glucagon (Stress + Ca). Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen dem jeweiligen Ulcus-Index, Glucagon oder Calcitonin, wenn sie als einzelne Variable betrachtet werden. Aber es ergibt sich eine signifikante, negative Korrelation, wenn der Ulcus-Index der Summe aus Calcitonin- und Glucagon-Konzentration gegenübergestellt wird.

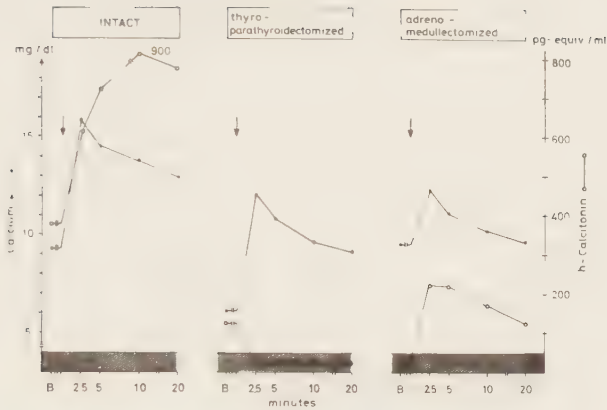


Abb. 1 : Wirkung einer intravenösen Injektion (Dauer 2 min) von Calcium-Glukonat bei ungestressten Ratten. Die Punkte bezeichnen die Ergebnisse der gepoolten (n = 5) Blutproben aus der abdominellen Vena cava. B : Mittelwert zweier Bestimmungen vor der Injektion. Beachtenswert ist, daß im Nüchtern-Serum von TPX-Ratten immunreaktives Calcitonin messbar ist, aber nicht bei AMX-Ratten. Die schraffierte Fläche bezeichnet die Nachweisgrenze des Assays. Die Pfeile bedeuten den Beginn der Calcium-Injektion.

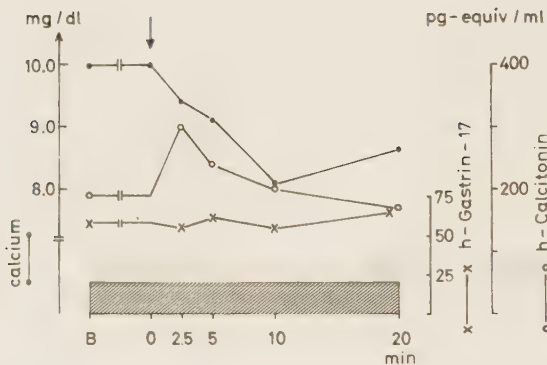


Abb. 2 : Antwort von Serum-Calcium, Calcitonin und Gastrin bei ungestressten Ratten ($n = 5$, gepoolte Proben) auf dieselbe Dosis von Calcium-Glucuronat wie in Abb. 1, jedoch als kontinuierliche Infusion. Symbole siehe Abb. 1.

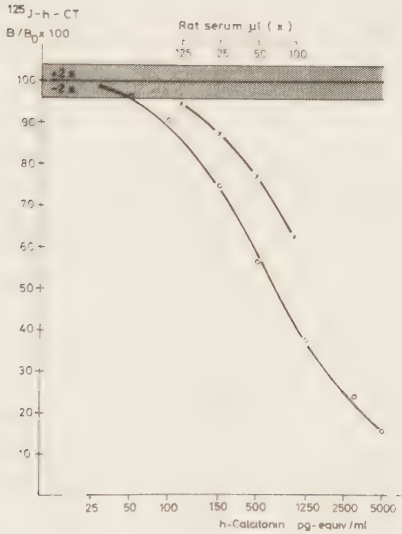


Abb. 3 : Standard-Kurve für die Bestimmung von huma-

nem Calcitonin (h-CT), wie sie im Abschnitt "Methoden" beschrieben ist, und eine parallele Verdünnungskurve, wie sie mit Serum erzielt wurde, das von Tieren nach intravenöser (Abb. 1) oder intragastraler (Abb. 2) Calcium-Glukonat-Belastung stammt. Die Nachweisgrenze für Serum-Calcitonin bei Ratten (50 - 60 pg-equiv/ml, Mikroliter-Kurve) erreicht die absolute Grenze des Calcitonin-Nachweises (5 - 6 pg h-CT/Röhre), wenn dieser zwei Standardabweichungen (schraffierte Fläche) von B₀ = 100 % antikörpergebundener Tracer in Abwesenheit von unspezifischem Antigen zugrunde gelegt wird.

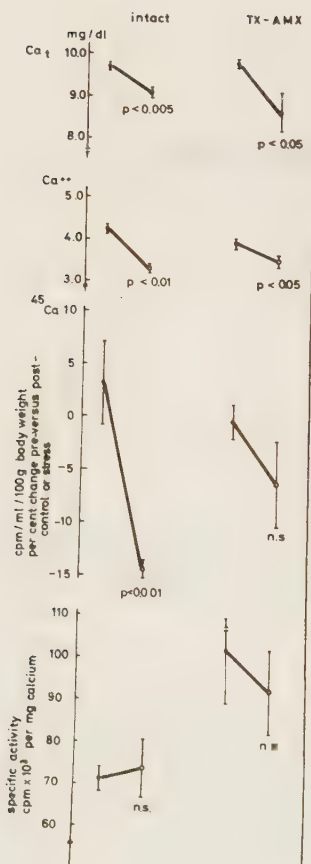


Abb. 4 : Einfluß einer entweder 8-stündigen Kontrollperiode (= kein Stress) oder eines Fesselungsstress (o = Stress) auf das Serum-Calcium bei intakten und calcitonin-freien Ratten. Die Kontroll- oder Stress-Gruppen enthielten jeweils $n = 10$ Tiere. Von oben nach unten : Gesamt-Calcium (Ca_t), ionisiertes Calcium (Ca^{++}), relative Änderung der Serum- ^{45}Ca -Radioaktivität, Spezifische Aktivität von ^{45}Ca . Beachte, daß der letzte Parameter sich nicht signifikant ändert.

Tabelle 1 : Wirkung exogener Calcium-Salze auf das Serum-Gesamt-Calcium und die Hormone des Stresssystems (8 h). Die resultierende absolute Frequenz von Stressoren wurde weiter in Beziehung gesetzt zur Effektivität der Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe (Anzahl der Tiere pro Gruppe).

	Calcium mg%	Calcitonin pg-equiv/ml	Glucose mg/ml	Cortisol pg-equiv/ml	Stress- Index	Stress- Index
A. Einfluß von Applikationsart und Dosis; Calcium-Glucostat; pH 6.3						
1. Subcutane Injektion nach 0, 180, 360 Minuten						
Vehikel (0.9% NaCl)	8.63 ± 0.10 (8)	152 ± 22 (8)	238 ± 36 (8)	32 ± 3 (8)	25.9 ± 4.3 (8)	100
13.5 mg	9.52 ± 0.15 ^c (4)	147 ± 20 (4)	199 ± 23 (4)	36 ± 1 (4)	27.5 ± 8.3 (4)	94
2. Intraperitoneale Injektion nach 0, 180, 360 Minuten						
Vehikel (0.9% NaCl)	8.64 ± 0.11 (4)	203 ± 48 (4)	230 ± 35 (4)	25 ± 4 (4)	27.9 ± 6.2 (4)	100
4.5 mg	8.20 ± 0.24 (8)	122 ± 27 (8)	243 ± 36 (8)	37 ± 5 (8)	14.9 ± 2.4 ^a (8)	117
9.0 mg	9.08 ± 0.24 (8)	180 ± 52 (7)	383 ± 99 (7)	44 ± 12 (6)	12.7 ± 4.0 ^a (7)	154
13.5 mg	9.13 ± 0.15 (12)	163 ± 14 (9)	274 ± 55 (11)	34 ± 7 (10)	8.8 ± 2.2 ^a (12)	158
3. Intraperitoneale Infusion, 0 - 450 Minuten						
Vehikel (0.9% NaCl)	8.10 ± 0.11 (8)	176 ± 35 (8)	—	30 ± 4 (8)	20.9 ± 5.3 (8)	100
36 mg	8.75 ± 0.11 (10)	176 ± 32 (10)	284 ± 57 (10)	31 ± 3 (10)	23.2 ± 5.0 (10)	114
72 mg	9.26 ± 0.12 ^a (8)	155 ± 31 (7)	226 ± 36 (8)	27 ± 4 (8)	16.5 ± 3.1 (8)	139

Calcium mg	Calcitonin pg-equiv/ml	Substrate pg/l.	Ca ²⁺ in serum mg/l	Mean Index	Standard Error
---------------	---------------------------	--------------------	-----------------------------------	---------------	-------------------

3. Einfluss des Anions; intragastrale Infusion, o - 180 Minuten; 15 mg; pH 4.3

1. Calcium	9.00 ± 0.17 (o)	139 ± 14 (o)	425 ± 103 (o)	36 ± 4 (o)	11.0 ± 3.3 ¹ (o) 15 ²
2. Ca-Karbonat	6.95 ± 0.17 (o)	147 ± 14 (o)	132 ± 19 (o)	33 ± 4 (o)	7.1 ± 1.2 ¹ (o) 10 ²

Details siehe Tabelle 2 (Intakt)

C. Einfluss des pH des Lösungsmittels; intragastrale Infusion, o - 180 Minuten; 45 mg; pH 1.7

1. Calcium	6.77 ± 0.09 (o)	159 ± 24 (o)	236 ± 44 (o)	19 ± 1 (o)	26.7 ± 3.7 (o) 100
2. Ca-Karbonat	6.74 ± 0.08 (o)	155 ± 34 (o)	203 ± 27 (o)	15 ± 1 (o)	15.4 ± 3.4 ¹ (o) 10
3. Ca-Karbonat	6.67 ± 0.11 (o)	129 ± 0 (o)	366 ± 176 (o)	37 ± 1 (o)	24.4 ± 5.3 (o) 115

1. Verteilungskoeffizient = 100 %

2. $\frac{1}{2}$; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30 ; 31 ; 32 ; 33 ; 34 ; 35 ; 36 ; 37 ; 38 ; 39 ; 40 ; 41 ; 42 ; 43 ; 44 ; 45 ; 46 ; 47 ; 48 ; 49 ; 50 ; 51 ; 52 ; 53 ; 54 ; 55 ; 56 ; 57 ; 58 ; 59 ; 60 ; 61 ; 62 ; 63 ; 64 ; 65 ; 66 ; 67 ; 68 ; 69 ; 70 ; 71 ; 72 ; 73 ; 74 ; 75 ; 76 ; 77 ; 78 ; 79 ; 80 ; 81 ; 82 ; 83 ; 84 ; 85 ; 86 ; 87 ; 88 ; 89 ; 90 ; 91 ; 92 ; 93 ; 94 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 99 ; 100

gegen Verteilungskoeffizient in der ersten Spalte zu
gegen Verteilungskoeffizient von intakten Ratten
der Tabelle 2

$p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$

Tabelle 2: Wirkung von 6 n Stress alleine (= ST, oder in Kombination mit einer konstanten Infusion von 5 mg/kg/d h. Calcium-Glukonat (= ST + Ca) bzw. eines Vehikels (= ST + V; über eine Magenfistel auf das Verhalten von Ulcerus und die Konzentrationen von Serum-Hormonen. C = Kontrolle (keine Behandlung).
(/): Anzahl der Tiere pro Gruppe. Zur Bezeichnung der Gruppen siehe Abschnitt "Methoden".

Gruppen	Bezeichnung	Ulcerus-Index	Calcium mg %	Calcitonin pg-equiv/ml	Glucagon pg/ml	Gastrin pg-equiv/ml
Intakt	C	0 (9)	9.03 ± 0.02 (9)	149 ± 20 (8)	110 ± 13 (9)	40 ± 5 (9)
	ST	24.8 ± 3.6 (10)	6.03 ± 0.12 ^o (10)	158 ± 17 (10)	179 ± 27* (10)	37 ± 4 (10)
	ST + Ca	6.0 ± 2.0 ^o (10)	8.69 ± 0.16 (10)	172 ± 19 (10)	342 ± 69* (10)	26 ± 4* (10)
	ST + V	24.3 ± 2.6 (11)	9.02 ± 0.21 (11)	152 ± 39 (11)	217 ± 43* (11)	36 ± 3 (11)
sham-op	C	0 (5)	9.55 ± 0.0 ^o (5)	112 ± 12 (5)	63 ± 20 (5)	28 ± 3 (5)
	ST	19.6 ± 3.8 (7)	8.62 ± 0.07 ^o (9)	133 ± 12 (9)	172 ± 24* (9)	35 ± 4 (9)
	ST + Ca	5.6 ± 1.8* (9)	3.98 ± 0.10* (9)	220 ± 22** (9)	266 ± 34* (9)	36 ± 4 (9)
ov	C	0 (8)	9.09 ± 0.27 (8)	129 ± 11 (8)	101 ± 6 (8)	23 ± 1 (8)
	ST	22.4 ± 5.1 (8)	8.67 ± 0.15 (8)	117 ± 11 (8)	157 ± 17** (8)	25 ± 2 (8)
	ST + Ca	14.9 ± 3.9* (9)	9.24 ± 0.12** ^a (9)	125 ± 11 ^{xx} (3)	166 ± 33 ^{ox} (9)	32 ± 3 (9)
TX-VX	C	0 (9)	9.43 ± 0.21 (8)	n.m. (2)	77 ± 37 (2)	29 ± 1 (9)
	ST	30.0 ± 7.0 (2)	5.93 ± 0.32 (8)	n.m. (2)	127 ± 25 (2)	23 ± 1 (8)
	ST + Ca	20.3 ± 4.3 ^{xx} (1)	10.12 ± 0.31 ^{xxx} (3)	n.m. (2)	311 ± 71* (2)	23 ± 1 ^{xx} (2)

Signifikanz-Grenzen sind wie folgt angegeben: *; **; o;

gegen Kontrolltiere
gegen Intakt
gegen sham-op

p < 0.05; p < 0.01; p < 0.001

a; o; o;
x; xx; ;

Tabelle 3 : Korrelationen zwischen Variablen, wie sie in der vorliegenden Studie gemessen wurden, während Stress alleine (links) oder, wenn der Stress durch exogenes Calcium-Glukonat ergänzt wurde (rechts). n_1 beinhaltet 4 Mittelwerte von Gruppen, die mit Stress alleine, und 4 von Gruppen, die mit Stress und Gabe des entsprechenden Vehikels, wie in Tabelle 1 und 2 angegeben, behandelt wurden. n_2 enthält in Analogie die Daten der Tabelle 1, A, 1 - 3, und der Tabelle 2.

Stress alleine				Stress + Calcium			
Variable	n_1	r	p	Variable	n_2	r	p
y = Calcium				y = Calcium			
x = Gastrin	8	0.248	n.s.	x = Gastrin	10	0.344	n.s.
Glucagon		-0.152	n.s.	Glucagon		-0.154	n.s.
Calcitonin		-0.637	n.s.	Calcitonin		-0.309	n.s.
Multivariant:				Multivariant:			
y = Calcium				y = Calcium			
x_1 = Glucagon	8	0.00		x_1 = Glucagon	10	0.00	
x_2 = Calcitonin				x_2 = Calcitonin			
y = Calcitonin				y = Calcitonin			
x = Gastrin	8	-0.362	n.s.	x = Gastrin	10	-0.742	<0.01
Glucagon		0.697	< 0.05	Glucagon		0.101	n.s.
Multivariant:				Multivariant:			
y = Gastrin				y = Gastrin			
x_1 = Glucagon	8	-0.48	n.s.	x_1 = Glucagon	10	-0.83	<0.01
x_2 = Calcitonin				x_2 = Calcitonin			
$n_1 + n_2 = 18$		-0.77	< 0.001				
y = Ulcus-Index				y = Ulcus-Index			
x = Gastrin	8	0.267	n.s.	x = Gastrin	10	0.228	n.s.
Glucagon		-0.268	n.s.	Glucagon		-0.245	n.s.
Calcitonin		-0.641	n.s.	Calcitonin		-0.429	n.s.
Multivariant:				Multivariant:			
y = Ulcus-Index				y = Ulcus-Index			
x_1 = Calcitonin	8	-0.67	<0.05	x_1 = Calcitonin	10	-0.57	n.s.
x_2 = Glucagon				x_2 = Glucagon			
$n_1 + n_2 = 18$		-0.57	<0.01				

DISKUSSION

Verschiedene Autoren beschrieben radioimmunologisch meßbares Calcitonin in der venösen Peripherie von Ratten (18, 19, 5) und erwachsenen Menschen (20, 21). Die parallele Dilutionskurve eines, während intravenöser Calcium-Infusion gesammelten, Pool-Serums (Abb. 3) zeigt, daß Serum-Konzentrationen von 50 - 60 pg-equiv/ml und darüber zuverlässig meßbar sind. Offenbar sind bei beiden Spezies jene Teile der Molekülstruktur, die für die Immunreaktion zuständig sind, annähernd identisch. Byfield (persönliche Mitteilung) bewies, daß sich beide Peptidketten nur in 4 Aminosäuren unterscheiden.

Der deutliche Abfall des Serum-Calcium nach intragastraler Calcium-Gabe (Abb. 2) und die gleichzeitige Beobachtung eines Peaks an immunoreaktivem Calcitonin lassen vermuten, daß bei ungestressten Ratten eine hochempfindliche Verbindung zwischen Gastroduodenaltrakt und sekretorischer Aktivität der C-Zellen besteht.

Als Folge unterschiedlicher Darreichungsformen von Calcium wurden Schwankungen des Serum-Calcium-Spiegels beobachtet (Tab. 1). Eine Modulation der Calcitonin-Sekretion mußte daher angenommen werden. Die ersten Experimente wurden daher auf die Frage gerichtet, ob die kon-

tinuierliche, intragastrale Infusion von Calcium-Gluconat eine, anderen Applikationsformen überlegene, anti-ulcerogene Wirkung zeigen kann. Als Grundlage wurde sowohl die Wirksamkeit während Stress, als auch jene über einen weiten pH-Bereich des Mageninhalts dargestellt (Tab. 1). Da das Serum-Gastrin immer unverändert bleibt, erlauben die Daten keine Rückschlüsse auf die Reihenfolge der Ereignisse : direkte Stimulation der G-Zellen durch Calcium und / oder antrale Dehnung mit sekundärer Calcitonin-Freisetzung oder primäre Triggerung der Calcitonin-Freisetzung über einen Calcium-Gradienten auf der Ebene der Rezeptoren der C-Zellen. Auf der Suche nach einem intestinalen Signal während der Nahrungsaufnahme beschrieben Talmage et al (22) ebenfalls erhöhtes Gastrin.

Der Nachweis von Calcitonin im Serum von TX- und TPX-Ratten (Tab. 2, Abb. 1) bestätigt frühere Vermutungen (23, 24), weicht aber von den Befunden anderer Autoren ab (5, 19). Unsere Annahme, daß das Nebennierenmark eine Calcitonin-Quelle sein könnte, stützt sich auf die Beobachtung eines unmeßbar niedrigen Calcitonin-Spiegels bei TX-AMX-Ratten (Tab. 2), sowie den nur geringen Calcitonin-Anstieg als Antwort auf intravenöses Calcium bei AMX-Ratten (Abb. 1). Im menschlichen Blut wurden mehrere verschiedene Molekülspezies von Calcitonin identifiziert (25, 26). Bis jetzt existieren jedoch nur wenige Informationen über Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit. Da Ratten mit Calcito-

- . -

nin-Mangel (TX, TX-AMX) eine mehr oder weniger deutliche Calcium-Intoleranz zeigen (Tab. 2), muß diesem Hormon eine protektive Rolle gegenüber drohender Hypercalcämie in besonderen Notsituationen, wie etwa schwerem Stress, zugeschrieben werden.

In Abwesenheit von Calcitonin-Quellen und während Stress sind Gesamt-Calcium und ionisiertes Calcium niedriger, verglichen mit intakten Tieren. Da aber die spezifische Aktivität des ^{45}Ca Calcium ziemlich konstant ist und zwischen Serum-Glucagon und -Gastrin keine Korrelationen bestehen, kann die Entwicklung der Stress-Hypocalcämie als unabhängig von Calcitonin betrachtet werden. Der nicht signifikante Abfall der ^{45}Ca Calcium-Radioaktivität bei calcitoninfreien Tieren (TX-AMX) könnte gegen diese Interpretation sprechen. Dieser mag Ausdruck des sehr niedrigen Knochenumsatzes bei den etwas älteren Ratten (250 g) sein. Die Wahrscheinlichkeit ist groß, daß dann eine Inkorporationsperiode von 14 Tagen für den Tracer zu kurz war. Da Adrenalektomie den Zuwachs an Stress-Hyperglucagonämie noch verstärkt (1), spricht die Hypocalcämie nach Adrenomedullektomie in dieser Studie (Tab. 2) auch für eine mögliche ursächliche Beteiligung von corticalen Steroiden (27, 9). Als Folge der Behandlung mit α -adrenergen Substanzen wurde, ebenfalls bei Ratten, eine Freisetzung von Parathormon beobachtet (28). Die genaue Rolle der Nebenschilddrüsen

während der Stress-Hypocalcämie ist derzeit unbekannt.

Die Bildung von Chelaten zwischen Calcium und Komplexbildnern wurde als Ursache der Zerstörung der sog. Mukosa-Barriere des Magens und der nachfolgenden Rückdiffusion der H^+ -Ionen erkannt (29). Entsprechend könnte die Neutralisation der Stress-Hypocalcämie durch intragastrales Calcium-Glukonat die optimale Permeabilität der Mukosa wiederherstellen, mit der Folge eines verminderten H^+ -Effluxes. Dies müßte umgekehrt zu einem verbesserten Ulcus-Index führen. Unter Stress + Calcium zeigen aber nur jene Gruppen einen stark verbesserten Ulcus-Index, welche ständig ein konstant niedriges Serum-Calcium aufweisen. Im Gegensatz zu diesem Befund stehen die Ergebnisse von Ratten mit Calcitonin-Mangel (TX, TX-AMX). Sie weisen einen schlechteren Ulcus-Index auf und ihr Serum-Calcium ist signifikant höher. Die Unterschiede im aktuellen Serum-Calcium, Serum-Calcitonin und im Ulcus-Index sprechen deshalb dafür, daß endogenes Calcitonin jene Substanz ist, welche die Calcium-induzierte Anti-Ulcerogenität vermittelt. In Analogie zu hypocalcämischen Zuständen beim Menschen, bei welchen eine überschießende Calcitonin-Freisetzung durch intravenöse Calcium-Infusion beobachtet wird (6), könnte die Stress-Hypocalcämie der Ratte als ein brauchbares Modell für weitere Calcitonin-Sekretionsstudien gelten.

Der unter zusätzlichem Calcium ebenfalls leicht verbesserte Ulcus-Index bei TX-Ratten wird besser verständlich, wenn man in Betracht zieht, daß exogenes Calcium die Nebenschilddrüsen supprimiert. Parathormon als potentieller ulcerogener Faktor wird damit ausgeschaltet.

Beim Menschen wurde beobachtet, daß durch eine Calcitonin-Schußinjektion mahlzeit-stimuliertes Gastrin unterdrückt wird (30). Als Folge einer Glucagon-Schußinjektion fällt die Nüchtern-Konzentration von Gastrin im Serum ab (31). Diese Befunde stimmen gut überein mit der umgekehrten Korrelation von Gastrin und der Summe von Calcitonin und Glucagon im Stress, wenn zusätzlich Calcium verabreicht wird (Tab. 3). Innerhalb der Zielsetzung unseres Experimentes ist daher die Annahme berechtigt, daß die aktuelle Konzentration von zirkulierendem und, sehr wahrscheinlich, säureproduzierendem Gastrin von der Summe der begleitenden Konzentrationen von zirkulierendem Calcitonin und Glucagon limitiert wird. Beide müssen als Säureinhibitoren betrachtet werden (10, 32, 33, 34). Es erscheint denkbar, daß der aus Stress-Situationen resultierende Ulcus-Index der Ratte aus der wechselseitigen Beeinflussung der drei Peptidhormone erklärbar wird.

Diese Spekulationen würden einen attraktiven Ausblick auf die bis jetzt noch nicht vollständig bekannte in vivo-Rol-

le von Calcitonin, in etwas geringerem Umfang auch von Glucagon, gestatten.

ZUSAMMENFASSUNG

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (200 - 250 g) wurden dem Fesselungsstress unterzogen. Sie erhielten entweder keine zusätzliche Behandlung oder Calcium unter verschiedenen Injektionsarten, bzw. mittels konstanter, intragastraler Infusion. Eine wirksame Prophylaxe der Magenläsionen (= Ulcus-Index) wurde mit 45 mg/kg/8h Calcium-Glukonat oder Calcium-Karbonat unter intragastraler Infusion bei pH 6.3 erzielt.

Auf der Suche nach dem Mechanismus, der dieser nützlichen Calcium-Wirkung zugrunde liegt, wurden drei Aspekte stressbedingter, metabolischer Veränderungen mittels verschiedener Modell-Ratten untersucht :

1. die Natur der Stress-Hypocalcämie
2. die Rolle von endogenem Calcitonin, unter Zuhilfenahme von Ratten, denen die Calcitonin-Quellen entfernt waren (Schilddrüse, Nebennierenmark) und durch radioimmunologisch messbares Serum-Calcitonin
3. die mögliche Mitwirkung der Hyperglucagonämie und des Serum-Gastrins auf die Hypocalcämie und auf den Ulcus-Index.

Wichtigste Ergebnisse :

1. Die Stress-Hypocalcämie entwickelt sich unabhängig von den Calcitonin-Quellen, was am Abfall des Serum-Calciums (Gesamt-Calcium, ionisiertes Calcium), aber auch an der gleichbleibenden, spezifischen Aktivität von ^{45}Ca im Serum demonstriert wird.

2. Die Hyperglucagonämie ist immer vorhanden und Gastrin bleibt unverändert. Das im Stress und unter zusätzlichem Calcium messbare Calcitonin ist bei thyreoidektomierten Ratten geringfügig niedriger als bei intakten Ratten ($117 \pm \text{SEM } 11$ gegen $158 \pm 17 \text{ pg-equiv/ml}$). Bei Ratten ohne Schilddrüse und Nebennierenmark (calcitonin-frei) finden sich Nullwerte. Ebenso ist die Abnahme des Ulcus-Index bei intakten ($p < 0.001$) und bei scheinoperierten ($p < 0.05$) Ratten deutlich, bei thyreoidektomierten und calcitonin-freien Tieren jedoch nur mäßig. Darüber hinaus zeigen Ratten ohne Schilddrüse und ohne Nebennierenmark eine Intoleranz gegenüber exogenem Calcium. Daher ist die Annahme naheliegend, daß endogen freigesetztes Calcitonin die anti-ulcerogene Wirkung des von außen zugeführten Calciums vermittelt.

3. Die deutlich umgekehrten Korrelationen zwischen der Plutkonzentration von Gastrin und der Summe von Calcitonin und Glucagon, ebenso wie zwischen den beiden letzt-

genannten und dem Ulcus-Index, lassen die Schlußfolgerung zu, daß Calcitonin und Glucagon den während Stress erreichbaren Gastrin-Spiegel beeinflussen. Umgekehrt könnte dieser wiederum die Größe des Ulcus-Index begrenzen.

LITERATUR

1. Schwille, P.O., Schellerer, W., Reitzenstein, M. und P. Hermanek, Expereintia 30: 824, 1974
2. - , - , Steiner, H. und M. Reitzenstein, Res exp Med 167: 149, 1976
3. - , Steiner, H., Samberger, N.M. und W. Schellerer, Res exp Med 165: 291, 1975
4. Burford, H.J., Ontjes, D.A., Cooper, C.W., Parlow, A. F. und P.F. Hirsch, Endocrinology 96: 340, 1975
5. Deftos, L.J., Boorman, G.A. und B.A. Roos, Horm Metab Res 8: 83, 1976
6. - , Powell, D., Parthemore, J.G. und J.T. Potts jr., J Clin Invest 52: 3109, 1973
7. West, T.E.T., O'Riordan, J.L.H., Copp, D.H., Bates, R. F.L. und A.D. Care, J Endocr 56: 463, 1973
8. Guth, P.H. und X.Kozbur, Am J Dig Dis 14: 113, 1969
9. Brown, P.A., Brown, T. und J. Vernikos-Danellis, Life Sci 18: 339, 1976
10. Hesch, R.D., Schmidt, H., Hufner, M., Winkler, K., Hasenjäger M., Paschen, K. Becker, H.J., Fuchs, K. und W. Creutzfeldt, In: Proc 3rd Int Symp Endocr, William Heinemann Medical Books Ltd, London, 1972, p. 265
11. Schwille, P.O. und H. Steiner, Zschr Verstierk 17: 304, 1975
12. Anderson, E., Lindner, E. und V. Sutton, Am J Physiol 149: 350, 1947

13. Brodie, D.A. und H.M. Hanson, *Gastroenterology* 38:
353, 1960
14. Osterloh, G., Lagler, F., Staemmler, M. und F. Helm,
Arzneimittelforschg, 16: 901, 1966
15. Aguilar-Parada, E., Eisentraut, A.M. und R.H. Unger,
Am J Med Sci 257: 415, 1969
16. Dietrich, F.M., Hunziker, W.H. und J.A. Fischer, *Acta*
Endocr 80: 465, 1975
17. Schulak, J.A. und E.L. Kaplan, *Metab* 23: 1103, 1974
18. Kent, G.N. und R. W. Retallick, *Biochem Biophys Res*
Comm 66: 1251, 1975
19. Triggs, S.M., Hesch, R.D., Woodhead, J.S. und E.D.
Williams, *J Endocr* 66: 37, 1975
20. Parthemore, J.G., Deftos, L.J. und D. Bronzert, *J*
Clin Invest 56: 835, 1975
21. Merceron, R.E., Delorme, Ml., Raymond, J.P., Courrège,
J.P., Vallée, G. und H.P. Klotz, *Ann d'Endocr* 36: 363,
1975
22. Talmage, R.V., Doppelt, S.H. und C.W. Cooper, *Proc*
Soc Exp Biol Med 149: 855, 1975
23. Kaplan, E., Peskin, G.W. und C.D. Arnaud, *Surgery* 66:
167, 1969
24. Johansson, H. und P.G. Öhrn, *Upsala J Med Sci* 79: 175,
1974
25. Singer, F.R. und J.F. Habener, *Biochem Biophys Res*
Comm 61: 710, 1974

26. Deftos, L.J., Roos, B.A., Bronzert, D. und J.G. Parthemore, J Clin Endocr Metab 40: 409, 1975
27. Williams, G.A., Peterson, W.C., Bowser, E.N., Henderson, W., Hargis, G.K. und N.J. Martinez, Endocrinology 95: 707, 1974
28. Kukreja, S., Johnson, P.A., Ayala, G., Banarjee, P., Bowser, N.E., Hargis, K.G. und G.A. Williams, Proc Soc Exp Biol Med 151: 326, 1976
29. Chung, R.S.K., Sum, T.P., Goldman, H., Field, M. und W. Silen, Gastroenterology 59: 200, 1970
30. Fahrenkrug, J., Hornum, J. und J.F. Rehfeld, J Clin Endocr Metab 41: 149, 1975
31. Hansky, J., Soveny, C. und M.G. Korman, Gut 14: 457 1973
32. Hotz, J., Goebell, H., Minne, H. und R. Ziegler, Digestion 11: 311, 1974
33. Chistiansen, J. und L. Hendel, Scand J Gastroent 8: 81, 1973
34. - , Holst, J.J. und E. Kalaja, Gastroenterology 70: 688, 1976

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Dr. P. O. Schwille für die stete Hilfsbereitschaft und die wertvollen Anregungen zu dieser Arbeit. Ich danke auch Frau K. Schwille und Frau A. Wellmann für die ausgezeichnete technische Mitarbeit. Herrn Privatdozent Dr. E. David bin ich für die hilfreichen und kritischen Beiträge bei der Erstellung des Stressmodells dankbar. Ohne die großzügige Unterstützung durch die Robert Pfleger-Stiftung, Bamberg, und durch die Friedrich Baur-Stiftung zur Förderung der Medizinischen Wissenschaft, Burgkunstadt, wäre die Durchführung dieser Arbeit auf große Schwierigkeiten gestoßen.

LEBENS LAUF

Am 26.10.1949 wurde ich als Sohn des Omnibusfahrers Wilhelm Hofmann und seiner Ehefrau Betty Hofmann, geb. Möhrlein, in Bamberg geboren. Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule, von 1960 bis 1969 das Clavius-Gymnasium in Bamberg. Dort legte ich 1969 die Reifeprüfung ab. Anschließend leistete ich von 1969 bis 1971 meinen Pflichtwehrdienst. Im Sommersemester 1971 begann ich das Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, wo ich im Sommersemester 1973 das Physikum bestand. Zum Sommersemester 1974 wechselte ich an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Anfang 1977 bestand ich hier das Medizinische Staatsexamen.

Zwischen Januar 1975 und März 1976 arbeitete ich im Tierlabor der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen bei Privat-Dozent Dr. Dr. P.O. Schwille an meiner Dissertation.

Erlangen im Juni 1977

Georg Peter Hofmann

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990